

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-216441

(43) 公開日 平成4年(1992)8月6日

(51) Int.Cl.⁹

G 0 1 N 21/33

識別記号

庁内整理番号

7370-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数10(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平2-403315

(22) 出願日 平成2年(1990)12月18日

(71) 出願人 00005223

富士通株式会社

神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地

(72) 発明者 岡 浩太郎

神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地

富士通株式会社内

(72) 発明者 浅野 高治

神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地

富士通株式会社内

(72) 発明者 藤田 省三

神奈川県川崎市中原区上小田中1015番地

富士通株式会社内

(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外3名)

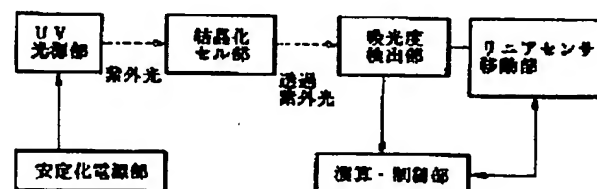
(54) 【発明の名称】 生体高分子溶液濃度の2次元測定方法および装置

(57) 【要約】

【目的】 生体高分子溶液濃度、より具体的には生体高分子結晶化過程を2次元で走査できる方法並びにこの方法を実施するための簡単な装置を実現することを目的とする。

【構成】 生体高分子溶液と結晶化剤を結晶化セルに装入し、紫外光源からの紫外光を該結晶化セルに照射し、該結晶化セルを透過した紫外光をリニアセンサーにより2次元に走査して透過光量を検出し、検出した透過光量よりタンパク質濃度換算を行うように構成する。

本発明装置の構成図



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体高分子溶液濃度の2次元測定方法であって、生体高分子溶液と結晶化剤を結晶化セルに装入し、紫外光源からの紫外光を該結晶化セルに照射し、該結晶化セルを透過した紫外光をリニアセンサーにより2次元に走査して透過光量を検出し、検出した透過光量よりタンパク質濃度換算を行うことを含んでなる前記測定方法。

【請求項2】 生体高分子溶液がタンパク質溶液である請求項1記載の測定方法。

【請求項3】 透過光量の検出を、1次元に配列したフォトダイオードにより行う請求項1記載の測定方法。

【請求項4】 検出した透過光量より吸光度を算出し、これよりタンパク質濃度換算を行う請求項1記載の方法。

【請求項5】 リニアイメージセンサーを作動させることにより、2次元での吸光度測定を行う、請求項1～4のいずれかに記載の測定方法。

【請求項6】 空の測定セルについて予じめ透過光量を検出して吸光度を測定し、該測定データを保持し、画素ごとに差分演算を行う請求項1記載の測定方法。

【請求項7】 紫外線光源部と結晶化セルと吸光度検出部および吸光度検出部からの透過光量を除算または差分演算を行う演算・制御部とから成り、紫外線光源部、結晶化セルおよび吸光度検出部の順序に配置されていることを特徴とする生体高分子溶液濃度の2次元測定装置。

【請求項8】 紫外線光源部が、紫外線光源と分光部から構成されている請求項7記載の2次元測定装置。

【請求項9】 紫外線光源が、重水素放電管または低圧水銀ランプである請求項7記載の2次元測定装置。

【請求項10】 分光部が、モノクロメーターまたは干渉フィルターである請求項1記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生体高分子溶液濃度の2次元測定方法および該方法を実施するための装置に関し、更に詳しくは生体高分子結晶化の過程を観察する方法および該方法を実施するために該高分子結晶化過程を2次元で走査する装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質、ポリペプチド核酸などの生体高分子は生体内でエネルギー代謝、構造構築、情報伝達などの重要な機能を果たしている。このような生体高分子の機能は、その構造に由来していることが知られてきている。そこで生体高分子の3次元構造を調べる必要が近年高まりつつある。3次元構造解析法としては、NMR（核磁気共鳴）法、X線回折法などが一般的な方法であるが、直接3次元構造解析が可能であることから、X線回折法が注目されている。

【0003】 X線回折を行うためには、構造の乱れが少

ない、良質な生体高分子結晶を得ることが重要である。しかしながら、良質な生体高分子結晶を得るのは従来困難であった。これは、結晶化条件が、各生体高分子で異なるために、試行錯誤に最適化条件決定を行う必要があったためである。また、生体高分子結晶の結晶核に成長過程についての知見が少ないことも、良質な生体高分子結晶を得ることを困難にしている。

【0004】 近年、生体高分子、とりわけ蛋白質結晶成長過程を詳細に調べようとする試みが成され始めた（例えばAzuma et al. J. Crystal Growth, 98, 371-376, 1989）。彼らの論文では、蛋白質結晶過程追跡を、結晶近傍の屈折率変化を微分干渉光学系を利用して測定することにより行っている。この方法により、結晶近傍での2次元濃度測定が可能となった。しかしながら微分干渉光学系による蛋白質濃度測定には幾つかの問題がある。まず第一には、蛋白質濃度を屈折率により測定するために、結晶母液中の溶質濃度変化を蛋白質濃度変化と誤認する可能性があげられる。また第二点目としては屈折率から蛋白質濃度への換算のためには、結晶近傍と母液中での干渉縞の間隔測定が必要であるために、画像処理など煩雑な操作が必要である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、紫外線を利用した2次元計測装置が分析、測定用に開発され始めている。この例として、紫外線を用いた2次元計測装置としては、例えば紫外顕微鏡などが挙げられる。この紫外顕微鏡に顕微鏡光度計システムを組み合わせることにより、細胞内カルシウム濃度測定やDNA量測定を行えるようにした装置が存在する。例えばカールツァイス社MPMシステムなどの例である。しかしながらこの装置は、生体高分子結晶解析用に設計されたものではなく、また用いる紫外光も、例えば蛋白質結晶に必要な紫外領域とは異なっている。またポイント測光は行えるものの、広範囲の測光を迅速に行うことは出来ない。

【0006】 従って、生体高分子の結晶化過程を2次元でかつ容易・迅速に追跡し、生体高分子溶液濃度の測定方法並びにこの方法を実施するための簡易でかつ小型の装置の開発が望まれていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明は上記課題を達成するためになされたものであり、本発明の生体高分子溶液濃度の2次元測定方法においては、生体高分子溶液と結晶化剤を結晶化セルに装入し、紫外光源からの紫外光を該結晶化セルに照射し、該結晶化セルを透過した紫外光をリニアセンサーにより2次元に走査して透過光量を検出し、検出した透過光量よりタンパク質濃度換算を行うことを含んでなる。

【0008】 更に、本発明は上記方法を実施するための生体高分子溶液濃度の2次元測定装置を提供するものであり、この装置は紫外線光源部と結晶化セルと吸光度検

3

出部および吸光度検出部からの透過光量を除算または差分演算を行う演算・制御部とから成り、紫外線光源部、結晶化セルおよび吸光度検出部の順序に配置されていることを特徴とする。

【0009】

【作用】すなわち、本発明では、多くの生体高分子が紫外線領域の光に特異的な吸収を示すことに着目して、紫外吸光度の2次元走査を行うように構成したものであり、従って蛋白質結晶成長過程、より具体的には蛋白質濃度の測定が2次元で行なえる。

【0010】以下、実施例により更に本発明を説明する。

【0011】

【実施例】

実施例1

図1は本発明装置の構成図である。この構成図に示されるように本発明装置は測定領域を特定紫外光で均一に照射することが可能な光源部、結晶化を行うセル部、蛋白質濃度変化を測定するための検出部（吸光度検出部）、検出部出力を生体高分子濃度換算を行うための演算・制御部により成り立っている。なお吸光度検出部には後記のようにリニアイメージセンサー移動部が接続されており、この移動部は演算・制御部と連係している。

【0012】紫外線光源部は、紫外線光源と分光部から構成されている。光源としては、例えば重水素放電管又は低圧水銀ランプが用いられる。この低圧水銀ランプは約10,000時間の長寿命を有する。分光部は、例えばモノクロメーター又は干渉フィルターから構成される。なお、紫外線光源部には電圧を一定に保持するための安定化電源部が接続されている。安定化電源装置は、通常の蛍光灯点灯回路を利用して作成できる。

【0013】濃度測定に必要な特定波長の紫外光を得るために、280nm(蛋白質に特異的波長)の光を得るためには、フォスファと干渉フィルタを用い、260nm(核酸に特異的波長)の光は低圧水銀ランプの254nmの輝線スペクトルで代用した。以上述べた光源装置により、下記に示す結晶化セルの紫外光透過面(4×10mm)を均一に照射することができる。

【0014】蛋白質結晶化セルは、結晶成長方式の違いから、液液界面2液拡散法と膜介在2液拡散法について実施できるように設計した(図2)。図2(A)は、液液界面2液法による場合の蛋白質結晶化セルの概略図であり、図2(B)は、膜介在2液拡散法による場合の蛋白質結晶化セルの概略図である。

【0015】液液界面2液拡散法は、結晶化剤溶液と蛋白質溶液との間で液液界面が形成され濃度勾配を形成せしめるようにしたものである。この方法による場合、結晶化セルは図2(A)に図示されるように蛋白質溶液と結晶化剤溶液とが結晶化セル1内に別個に導入できるように分枝管が設けられ、かつ各々には仕切り板2が設け

4

られている。また、セルの一方端は開口し、オーバフローした溶液を排出するように構成されている。この方法による場合は、仕切り板2を開け結晶化剤溶液を結晶化セル1の一方端に設けられた導管から該セル内に導入してセル1内を満たし、仕切り板2を閉じ、次いで仕切り板2'を開け蛋白質溶液を支管から該セル1に装入し該蛋白質溶液が該セル1のほぼ中央付近に位置するようになった場合に仕切り板2'を閉じる。この操作の過程においてオーバフローした結晶化剤溶液はドレイン管から排出される。

10

【0016】一方、膜介在2液拡散法は、膜の両側で濃度勾配を形成せしめるようにしたものである。この方法による場合、図2(B)に図示されるように結晶化セル1'のほぼ中央に透析膜3が取り付けられている。透析膜3の孔径は、結晶化剤を通過させ蛋白質は通過させないような大きさのものに選定される。この透析膜によってセル内を2つの室に2分し、一方の室に蛋白質溶液を導入するため、セルの一方端を開口し、更にオーバフローした溶液を排出する開口部を設けている。同様に他方の室に結晶化剤溶液を導入するため、セルの他方端を開口し、更にオーバフローした溶液を排出する開口部を設けている(図2(B)、図3参照)この方法の場合、例えば結晶化剤溶液と蛋白質溶液とを同時にセルに導入して実験を行うことができる。

20

30

【0017】いずれの方法であっても、蛋白質濃度勾配を形成し、この濃度勾配のどの辺で蛋白質の結晶が最初にできるかの知見を以下に述べる手順によって得る。なお、このような上記の2つの方法以外の方法、例えば静置パッチ法に関しても適用できることは明らかである。本実施例においては、紫外線吸光度測定を行うために、セル材質には石英ガラスを用いた。セルの厚さ(光路長)は、用いた蛋白質濃度(通常1~50mg/ml)を考慮して、2mmとした。また結晶化セルの縦・横の大きさは、1次元走査用センサーの大きさを考慮して、4×10mmとした。セルの形を直方体としたのは、石英ガラスの加工性の悪さのためである。実施例で用いる蛋白質溶液と結晶化剤溶液の量は、膜介在2液拡散法の場合にはそれぞれ0.3ml、1.5mlが適当であり、液液界面2液拡散法の場合には、それぞれ0.3mlが適当であった。

40

【0018】吸光度検出部には、紫外線の分光感度が高く、空間分解能の良さが要求され、このためリニアイメージセンサー(例えば浜松ホトニクス社製、S3923-1024Q)を用いた。このセンサーは25.6mmの範囲を、25μmの分解能で走査することができる。駆動回路としては、同じく浜松ホトニクス社製のMOSリニアイメージセンサー用駆動回路C4074とパルスジェネレータC4091を用いた。また出力はストレージオシロフコップに取り込ませた。リニアイメージセンサーにより4×10mmの2次元領域を走査させるために、25μm刻みにリニアイメージセンサーを移動させる必要がある。そのため、リニアイメ

50

5

ージセンサー移動のために、顕微鏡用メカニカルステージを用いた。この装置を用いることにより、 $4 \times 10 \text{ mm}$ の領域を $25 \mu \text{ m}$ 刻みで走査することが可能となった(図3)。

【0019】演算・制御回路は、リニアイメージセンサーの移動制御と紫外線検出部からの出力演算を行う。紫外線検出部での演算は、空の結晶化セルでの出力と測定時のセル出力の間での差分または除算演算を行う。この演算により、照射強度ムラを除くことができる。またこの演算部では、吸光度からの濃度換算を行うことも可能である。

【0020】

実施例2

蛋白質ミオグロビンを用いた場合の蛋白質濃度測定方法の一実施例を次に示す。実験は液液界面二液拡散法について行った。結晶化剤である硫酸溶液(97%飽和)と1.0%ミオグロビン溶液(55%飽和硫酸溶液に溶解)をそれぞれシリンジに充填し、三方コックにより連結して、石英ガラスセル(2(A)図参照)中に順に注入し、硫酸溶液とミオグロビン溶液の液液界面を形成し、静置した。実験は室温にて行った。

【0021】石英ガラスセルに溶液を注入する直前に、空の石英セルの透過光量を測定した。リニアイメージセンサーをメカニカルステージにより $25 \mu \text{ m}$ づつ移動させて、 $4 \times 10 \text{ mm}$ の石英セル全域について測定し、64000点*

表1 実験開始24時間後の吸光度

4250									
.68	.70	.75	.88	.90	.89	.80	.50	.44	
.68	.68	.77	1.01	.98	.90	.88	.60	.46	
.68	.68	.89	★	1.05	.99	.97	.58	.45	
.70	.88	.99	1.00	★	★	.90	.75	.48	
.68	.78	.87	1.12	1.08	.98	.80	.77	.48	
.68	.73	.85	.98	.90	.89	.82	.67	.45	

【0025】

【表2】

表2 実験開始48時間後の吸光度

.86	.70	.75	.85	★	★	1.20	.89	.68	
.84	1.52	1.93	★	★	★	1.80	1.00	.63	
1.00	★	.99	★	★	★	★	.98	.69	
1.70	.95	1.80	★	★	★	1.67	1.05	.75	
1.55	1.05	1.88	★	★	1.83	1.33	.81	.65	
1.23	.98	.85	.98	1.67	★	.99	.67	.68	

【0026】表1の結果から次の事実が判明した。すなわち、ミオグロビンの結晶化は実験開始後24時間位から

*からデータを取得した。石英セル中の測定点位置を図4に示す。取得したデータは空セルでの透過光量として16ビットアナログデジタル(AD)変換してマイクロコンピュータ内にストレージした。実験開始後は2時間ごとにデータの取得を行ない、結晶化過程の追跡を行った。

【0022】各測定点から得た出力は、空セルでのデータ(I_0)と各時間での透過光量(I)の比の常用対数を取ったもの(吸光度: A)としてデータ蓄積した。また吸光度は、Lambert-Beerの関係式、

$$\log(I_0/I) = A = k \times C \times l$$

(式中、 k はモル吸光係数であり、 C は蛋白質のモル濃度であり、 l は行路長(本実施例では 2 mm)である)を用いて蛋白質のモル濃度 C に換算できる。また、より簡便には、

$$\text{蛋白質濃度 (mg/ml)} = 1.45 \times A$$

の関係式を用いて換算できる。なお、上記式における1.45の値は吸光度から mg/ml 単位表示の濃度に変換する際の定数である。

【0023】実験開始24時間後および48時間後の具体的な吸光度の値を次の表1および表2に示す。なお、表1および表2中、角の値(4250)は左上の測定点番号を示す。また、★はスケールアウトしたことを示す。

【0024】

【表1】

50

始まった。結晶化は液液界面から $2 \sim 3 \text{ mm}$ 離れた位置から帯状に始まり(ちなみに、測定点4253~4255での吸光

7

度の値を参照)、結晶核の形成は吸光度の急峻な立ち上がりと吸光度の測定レンジからのスケールアウト(透過光が測定不能となったため)から判断できた(ちなみに、表2中の測定点4653, 4654, 4655, 5051, 5053, および5054などの吸光度の値を参照)。また、結晶核の周辺部では蛋白質濃度の増加が観測できた。

【0027】また、結晶核成長の様子は、結晶の占める測定点の数を追跡することにより行うことができる。ちなみに表2において、スケールアウトした位置において結晶核が成長していることが分かる。

【0028】

【発明の効果】本発明は、以上説明したように構成されるものであるから以下のような種々の効果を奏する。第一に生体高分子結晶化過程を2次元で追跡可能である。ちなみに、本発明の装置を用いることにより、蛋白質などの生体高分子結晶化過程を、空間分解能 $25\mu\text{m}$ 、濃度差分解能初期濃度の $1/100$ 、ダイナミックレンジ5～

8

50mg/mlで測定可能である。また従来の蛋白質濃度測定装置よりも光学系がはるかに単純であり、小型化、軽量化が実現できる。また、従来装置の問題点であった、塩濃度変化による測定誤差を完全に除去できる。更に従来装置より、濃度換算を容易に行うことができる。更にまた、本発明装置は種々の結晶化方法について適用可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明装置の構成図である。

10 【図2】蛋白質結晶化セルの概略図である。

【図3】本発明一実施例の要部斜視図である。

【図4】石英セル中の測定点位置を示すグラフである。

【符号の説明】

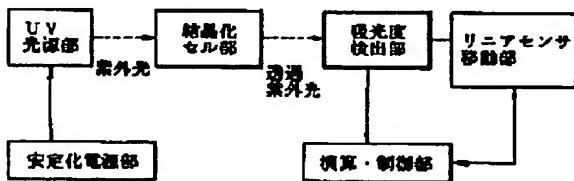
1, 1' ...結晶化セル

3...透析膜

4...リニアイメージセンサー

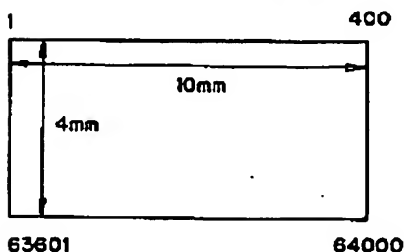
【図1】

本発明装置の構成図



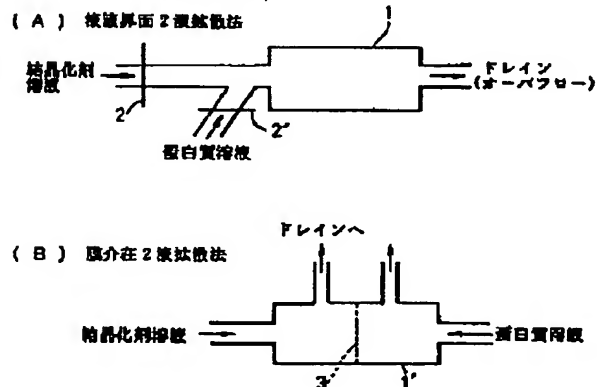
【図4】

石英セル中の測定点位置を示す図



【図2】

蛋白質結晶化セルの概略図



1, 1' ...結晶化セル

2, 2' ...仕切り板

3 ...透析膜

【図3】

